

STIC-ILL

233546

From: Afremova, Vera
Sent: Tuesday, February 20, 2001 4:04 PM
To: STIC-ILL
Subject: 09/445,796

Hi,
Please, could I have this reference:

1. Igarashi et al. Bifidus. 1994. 7:139-147.

Vera Afremova
au 1651
308-9351
CM1 11E13

N^o
2-20

CAI 2/22

ビフィズス菌およびラクチュロースの卵巢摘出骨粗鬆症 モデルラットの大腿骨に対する骨強度増強効果

五十嵐 稔^{1*}, 飯山百合子¹, 加藤 良¹

富田 守¹, 麻見 直美², 江澤 郁子²

^{1*}森永乳業総合研究所 ²日本女子大学食物学科

Effect of *Bifidobacterium longum* and Lactulose on the Strength of Bone in Ovariectomized Osteoporosis Model Rats

Minoru IGARASHI,^{1*} Yuriko IYAMA,¹ Ryo KATO,¹ Mamoru TOMITA,¹
Naomi OMI² and Ikuko EZAWA²

^{1*}Food Research & Development Laboratory, Morinaga Milk Industry Co., Ltd.

²Department of Food and Nutrition, Japan Women's University

要 旨 本研究では、卵巢を摘出し低カルシウム食で飼育し作成した骨粗鬆症モデルラットを用い、ビフィズス菌 (*Bifidobacterium longum*) およびラクチュロースがカルシウムの吸収にどのような影響を与えるか検討した。SD 系雌ラット 29 匹を卵巢摘出後カルシウム 0.01%、リン 0.3% を含む低カルシウム食で 31 日間飼育した。この骨粗鬆症モデルラットをカルシウム 0.3% (乳清カルシウム)、リン 0.3% を含む基本食と飲水の代りに 1% 脱脂粉乳溶液を投与した①群、基本食とビフィズス菌末懸濁液 (1% 脱脂粉乳溶液にビフィズス菌末を懸濁させたもの) を投与した②群およびラクチュロース 3.0% を添加した基本食とビフィズス菌末懸濁液を投与した③群に分けそれぞれの試験食でさらに 31 日間飼育した。その結果、糞便中のビフィズス菌数はラクチュロースを添加した③群が有意に増加した。また盲腸内容物の pH は糞便中のビフィズス菌数の増加とともに低下し、特に酢酸濃度は③群が著しく高かった。また大腿骨破断特性である破断エネルギー、破断応力は①群に比べ②③群とも高くビフィズス菌、ラクチュロースを摂取した③群が①群に対して有意に高かった。一方 Microdensitometry 法により求めた大腿骨の骨密度関連パラメーターのうち ΣGS 、 GS_{max} は有意な差はなかったが、①群に比べ②③群とも高い傾向がみられた。 $\Sigma GS/D$ は①群に対して②③群が有意な差をもって高く、 GS_{min} については①群に対して②群が有意に高かった。これらのことからビフィズス菌、ラクチュロースの摂取は腸内環境を改善することなどによりカルシウムの吸収を促進し大腿骨の破断特性である破断エネルギー、破断応力の増強および骨密度の増加をもたらすものと考えられる。

Abstract In the present study an ovariectomized osteoporosis model rat was used to investigate the effect of *Bifidobacterium* and undigestible lactulose on whey calcium absorption and bone fracture properties. Ovariectomized rats received a diet containing 0.01% Ca for 31 days. Thereafter, the rats were divided into three groups fed the following 3 diets for 31 days: a diet containing whey calcium (group 1), a diet containing whey calcium and *Bifidobacterium* culture suspended in drinking water (group 2), and a diet containing whey calcium and lactulose, and *Bifidobacterium* culture suspended in drinking water (group 3).

1993 年 9 月 13 日受付

*〒228 座間市東原 5-1-83 Higashihara, Zama 228,
Japan

The experiment yielded the following results. The number of bifidobacteria in the feces was significantly increased by administration of lactulose. The pH of the cecal contents was reduced concomitantly with increasing numbers of bifidobacteria in the feces, and the concentration of acetic acid in the cecal contents was significantly higher in group 3. The femur fracture properties (breaking energy and breaking force) in groups 2 and 3 were increased in comparison with animals fed only the whey calcium diet (group 1). There was no significant difference in the values of the microdensitometry parameters ΣGS and GS_{max} among the 3 groups, but $\Sigma GS/D$ was higher following administration of *Bifidobacterium* and lactulose as compared to group 1. This was a significant difference. GS_{min} in group 2 was statistically higher than that in group 1. These results suggest that administration of *Bifidobacterium* and lactulose promotes whey calcium absorption, and thereby increases the strength of bone.

Key words: lactulose, *Bifidobacterium*, whey calcium, ovariectomized rat

わが国におけるカルシウムの国民栄養所要量は成人で一日 600 mg と設定されているが平成 3 年度の国民栄養調査結果では平均摂取量は所要量の 90% 程度であり (18), この数年横ばい状態にある。この間にも寿命の伸びに伴う高齢化の波は着実に押し寄せており、カルシウム不足などに起因する骨粗鬆症の合併症である骨折の増加が深刻な社会問題になりつつある。骨折の危険性は peak bone mass にかなり依存している。そこで peak bone mass を高めることおよびその骨量を維持するため生涯にわたり十分なカルシウムを摂取する必要があると指摘されている。

カルシウムの吸収は生体の生理学的条件によって大きく左右され特に閉経後の女性ではカルシウムの吸収能が著しく低下するといわれている。この原因は主に高齢化による能動輸送の低下、エストロゲン (女性ホルモン) やカルシトニン等と深い関係を持っている。能動輸送の低下が加齢に伴う生理的なものとすれば、カルシウムの吸収を補うには単純拡散輸送を強化すること、すなわち吸収・生体利用性の優れたカルシウムの濃度を高める必要がある。

このような背景のもとに各種のカルシウムを強化した食品が飲料を初めとして数多く市場に出回っている。これらカルシウムのうち牛乳中のカルシウム (乳清カルシウムを含む) は吸収・生体利用性が優れているといわれ多く報告がなされている (13, 16)。これは、カゼイン (カゼインホスホペプチド) (20, 25), 乳糖 (2, 3) などにより説明されているが、いまだ詳細なメカニズムは不明である。江澤らは前回、カルシウム源として炭酸カルシウムおよび乳清カルシウムとそれぞれにラクチ

ニロースを加えた 4 種類の飼料を卵巢摘出骨粗鬆症モデルラットに摂取させ大腿骨の骨強度・骨密度等を比較した。その結果、炭酸カルシウムよりも乳清カルシウムの吸収・生体利用性がすぐれ、ラクチュロースを添加するとそれぞれ単独よりもさらに良好な結果が得られることを確認している (12)。

本報では乳酸・酢酸を産生し腸内環境を整える等の働きをもつ腸内において特に有用な腸内細菌として知られている (11, 27) ビフィズス菌およびビフィズス菌の増殖促進作用を有するラクチュロースをラットに与え、ビフィズス菌およびラクチュロースが乳清カルシウムの吸収・生体利用性にどのような影響を与えるかについて既報の卵巢摘出骨粗鬆症モデルラット (6) を用いて検討した。

材料と方法

1) 飼料原料等の調製：本実験に用いた乳清カルシウムおよび粗ラクチュロース粉末 (ラクチュロースを 40% 含有) の調製は既報 (12) によった。ビフィズス菌 (*Bifidobacterium longum*) 末は、グルコース濃度を 2% とした GAM 培地 (日本製薬) に培養後、菌体を遠心分離し生理食塩水にて洗浄し、濃縮菌液に蔗糖 2%, グルタミン酸ソーダ 1% を加えて凍結乾燥したものを使用した。

2) 実験動物および飼育条件：実験動物には体重約 90 g の SD 系雌ラット (日本クレア) 29 匹を使用した。

飼料組成は Table 1 に示した。動物は卵巢摘出 (17) 後カルシウム 0.01%, リン 0.3% を含む低カルシウム食で 31 日間飼育した。この骨粗鬆症モデルラットをカルシウム 0.3% (乳清カルシウム),

五十嵐 稔ほか：ビフィズス菌およびラクチュロースの骨強度増強効果

141

Table 1. Composition of experimental diet

Compound	(0.01% Ca 0.3% P)	Whey Ca	Whey Ca + <i>B. longum</i>	Whey Ca + lactulose 3% + <i>B. longum</i>
		*(Group 1)	*(Group 2)	*(Group 3)
0.3% Ca, 0.3% P				
Glucose monohydrate	65.3	65.0	65.0	57.5
Vitamin-free casein	18.0	18.0	18.0	18.0
Cystine	0.2	0.2	0.2	0.2
Cotton seed oil	10.0	10.0	10.0	10.0
CaCO ₃	0.023	—	—	—
Equimolar mixture of KH ₂ PO ₄ and K ₂ HPO ₄	0.9	0.1	0.1	0.1
Cellulose powder	3.0	3.0	3.0	3.0
Choline chloride	0.2	0.2	0.2	0.2
Water-soluble ^a vitamin mixture	0.1	0.1	0.1	0.1
Ca and P free ^b salt mixture	2.0	2.0	2.0	2.0
Fat soluble vitamin ^c	0.0104	0.0104	0.0104	0.0104
Whey calcium powder	—	1.2	1.2	1.2
Lactulose powder	—	—	—	7.5
Drinking water		1% skim milk + <i>B. longum</i>	1% skim milk + <i>B. longum</i>	1% skim milk + <i>B. longum</i>
Low calcium diet				
Experimental diet				

^a The water-soluble vitamin mixture consisted of 0.5% thiamine hydrochloride, 0.5% riboflavin, 0.5% pyridoxine, 2.8% calcium pantothenate, 2.0% nicotinamide, 20.0% inositol, 0.02% folic acid, 0.002% vitamin B₁₂, 0.01% biotin and 73.7% glucose monohydrate.

^b The Ca- and P-free salt mixture contained 57.7% KCl, 20.9% NaCl, 17.9% MgSO₄, 3.22% FeSO₄·7H₂O, 0.078% CuSO₄·5H₂O, 0.113% NaF, 0.004% CoCl₂·6H₂O, 0.01% KI, 0.04% MnSO₄·H₂O, 0.44% ZnSO₄·7H₂O and 0.005% (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O.

^c The fat-soluble vitamin mixture consisted of 0.67% β -carotene, 1.01% 2-methyl-1,4-naphthoquinone, 8.43% α -tocopherol and 89.88% vitamin D₃ (53600 IU/g).

* Group 1: n=10; Group 2: n=10; Group 3: n=9.

リン 0.3% を含む基本食と飲水の代りに 1% 脱脂粉乳溶液の投与群 (①群: 10 匹), 基本食とビフィズス菌末懸濁液 (1% 脱脂粉乳溶液にビフィズス菌を 10×10^7 /ml 懸濁させたもの) (28) の投与群 (②群: 10 匹) および粗ラクチュロース粉末 7.5% を添加した基本食とビフィズス菌末懸濁液の投与群 (③群: 9 匹) に分けそれぞれの試験食でさらに 31 日間飼育した。なお飼育は室温 22±1°C, 湿度 50±5%, 12 時間ごとの明暗サイクル (明期 8:00 a.m.~8:00 p.m., 暗期 8:00 p.m.~8:00 a.m.) の環境下で行った。試験食は自由摂取させたが飲水としては滅菌イオン交換水を 10:00 a.m.~5:00 p.m., 1% 脱脂粉乳溶液また

はビフィズス菌末懸濁液 40 ml を 5:00 p.m.~翌 10:00 a.m. の時間帯に投与した (滅菌イオン交換水を与える 10:00 a.m. までには①②③群の各ラットとも 1% 脱脂粉乳溶液またはビフィズス菌末懸濁液を飲み終っていた。なおビフィズス菌末懸濁液のビフィズス菌数は投与時間中にはほとんど変わらないことを確認した)。飼育期間中週 2 回、体重および飼料摂取量を測定した。

3) 粪便中のビフィズス菌数: 各群より 5 匹ずつランダムに抽出しそれぞれの糞便中のビフィズス菌数を計測した。試験食投与前 1 回、投与中 2 回 (投与開始後 16 日目および 23 日目) の糞便を 10 倍段階希釈法により希釈し 0.1 ml をコンラー

ジ株にて塩化リチウム 3 mg/ml とペニシリン G カリウム 0.02 unit/ml を添加した MGLP 寒天培地 (30) および BL 培地 (栄研化学) (22) に塗抹し培養した。培養は嫌気条件 (平沢製作所アナエロ・ボックス, ガス組成: N₂ 80% · CO₂ 10% · H₂ 10%) 下, 37°C, 72 時間とした。なお、投与したビフィズス菌とラット由来のビフィズス菌は MGLP, BL 寒天平板上のコロニー性状および菌形態の違いから判別し計測した (21)。

4) 血清生化学検査および剖検: 動物は解剖前に一晩絶食させ、ネンブタール麻酔下で下大動脈より採血した。血清中のカルシウムは OCPC 法 (24), リンは p-Methylaminophenol 還元法 (5), クレアチニンは Folin-Wu 法 (24), 総タンパク質は Biuret 法により測定した (8)。なお採血終了後速やかに肉眼的に器官・組織を観察した。

5) 盲腸内容物の pH および有機酸分析: 開腹時、盲腸内容物の全量をとりだし内容物重量を計量後、pH メーター (HORIBA, Twin pH B-112) により pH を測定した。有機酸は井村らの方法 (14) に従いカルボン酸分析システムにより分別定量した。

6) 大腿骨の破断試験および骨密度の測定: 既報 (12) に従い破断特性測定装置 Fig. 1 (飯尾電機 DYN-1255) によりプランジャースピード 100 cm/min, フルスケール 50 kg, チャートスピード 120 cm/min の条件で大腿骨の中央部分を破断し、破断エネルギーおよび破断応力を測定した。骨密度の測定は右大腿骨の周囲の軟部組織を除去後、アルミニウムステップウェッジとともに SOFRON M-40 (SOFRON 社) で軟 X 線写真を撮影し、これを Microdensitometry (MD) 法 (19) に供し、Fig. 2 に示すパラメーターを求めた。

7) 統計処理: 各データの有意差検定には Student の *t* 検定を用い 5% 以下の危険率で有意差が認められた場合に、群間の平均値に差があると判定した。

成 績

体重増加

各群間における体重増加については有意な差は認められなかった。また、実験期間を通じいずれ

の群においても試験食投与に起因したと考えられる一般状態の変化はなかった。

糞便中のビフィズス菌数

試験食投与前 1 回、投与中 2 回 (投与開始後 16 日目および 23 日目) の糞便のいずれにも①群には 10⁷ 倍希釈ではビフィズス菌が検出されなかった。しかし、②群には投与開始後 23 日目そして③群には投与開始後 16, 23 日目とも 10⁹ 倍希釈でもビフィズス菌が検出された (Table 2)。

血清生化学検査および剖検時における肉眼的所見

Table 3 に血清中のカルシウム、リン、クレア

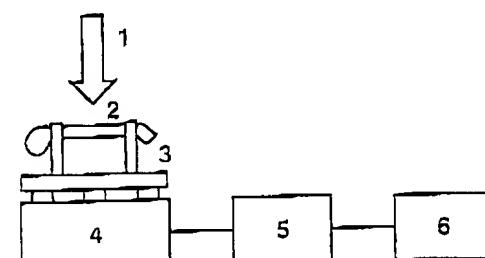


Fig. 1. A diagrammatic presentation of "Dynagraph" (Bone fracture properties measuring system). 1, plunger; 2, sample (femur); 3, sampleholder; 4, load-cell; 5, amplifier; 6, recorder.

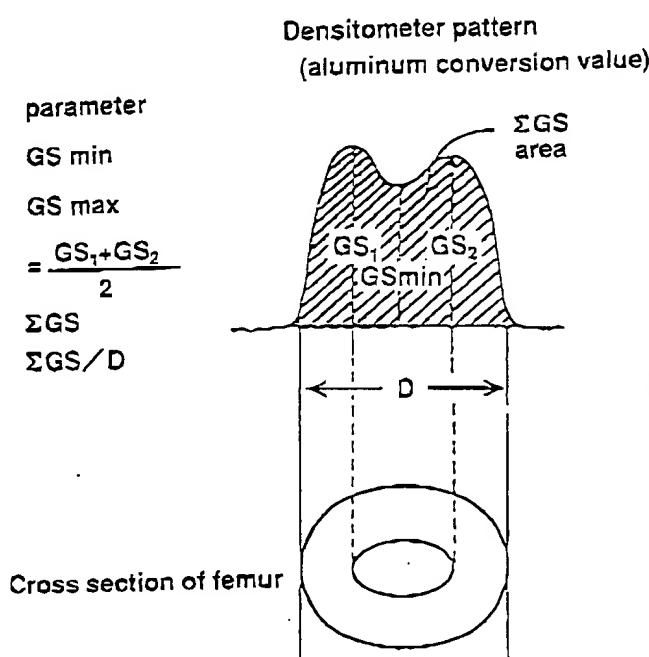


Fig. 2. Densitometer pattern and characteristics of x-ray microdensitometry (MD) analysis. Parameter: GSmin · GSmax (peak height), ΣGS (area), ΣGS/D (average height).

五十嵐 稔ほか：ビフィズス菌およびラクチュロースの骨強度増強効果

143

Table 2. Changes of number of *Bifidobacterium* in feces before and during administration of *B. longum*.

Group	Supplement	No. of rats	Before administration	During administration	
				day 16	day 23
1	Whey Ca	5	ND*	ND	ND
2	Whey Ca + <i>B. longum</i>	5	ND	ND	8.0** (20)***
3	Whey Ca + lactulose 3% + <i>B. longum</i>	5	ND	9.2±0.3 (80)	9.1±0.3 (100)

* Not detected.

** Values are expressed as *Bifidobacterium* counts (log No./g-feces).

*** Frequency of occurrence (%).

Table 3. Levels of serum Ca, P, creatinine and total protein.

Group	Supplement	No. of rats	Ca (mg/dl)	P (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)	Total protein (g/dl)
1	Whey Ca	10	10.38±0.13 ^a	7.66±0.32 ^a	0.75±0.02 ^a	6.09±0.14 ^a
2	Whey Ca + <i>B. longum</i>	10	10.03±0.14	7.04±0.38	0.79±0.02	6.19±0.30
3	Whey Ca + lactulose 3% + <i>B. longum</i>	9	10.14±0.23	7.08±0.35	0.77±0.02	6.30±0.23

^a Mean±SE.

Table 4. pH and organic acids (mg/g-feces) in the cecal content.

	Whey Ca n=10	Whey Ca + <i>B. longum</i> n=10	Whey Ca + lactulose 3% + <i>B. longum</i> n=9
pH	7.09±0.06 ^a	7.05±0.05	6.11±0.12*
Lactic acid	0.26±0.03 ^a	0.23±0.01	0.96±0.20*
Acetic acid	0.59±0.05	0.62±0.07	1.14±0.16*
Propionic acid	0.33±0.03	0.29±0.03	0.40±0.06
Citric acid	0.03±0.01	0.03±0.01	0.06±0.01*
Butyric acid	0.23±0.03	0.21±0.03	0.49±0.09*
Succinic acid	0.02±0.01	0.02±0.01	0.09±0.02*
Valeric acid	ND**	0.02±0.01	0.03±0.01

^a Mean±SE.* Significant difference from whey Ca diet group ($p<0.05$).

** Not detected.

チニンおよび総タンパク質濃度を示した。これらの血清生化学値には各群間に有意差はみとめられず、データはすべて正常範囲にあった。また肉眼的に器官・組織を観察したところ、ラクチュロースを与えた③群の盲腸は他の群のそれに比しやや肥大の傾向を示していた。その他は特に差を認めなかった。

盲腸内容物のpHおよび各有機酸濃度の比較

盲腸内容物のpHは①群と比べ②群はわずかに低く③群は有意に低かった。また、盲腸内容物の有機酸は①群に対して②群は酢酸濃度がわずかに高く③群は酢酸濃度、乳酸濃度とも有意に高かった (Table 4)。

大腿骨の破断力エネルギー、破断応力および骨密度

大腿骨の破断力エネルギー、破断応力とも①<②<③群の順に高く、ビフィズス菌およびラクチュロースを飼料に添加した③群が①群に対して有意に高かった。また右大腿骨のMD法における骨密度関連パラメーターのうち、 ΣGS 、 GS_{max} については有意な差は認められなかったが、②③群

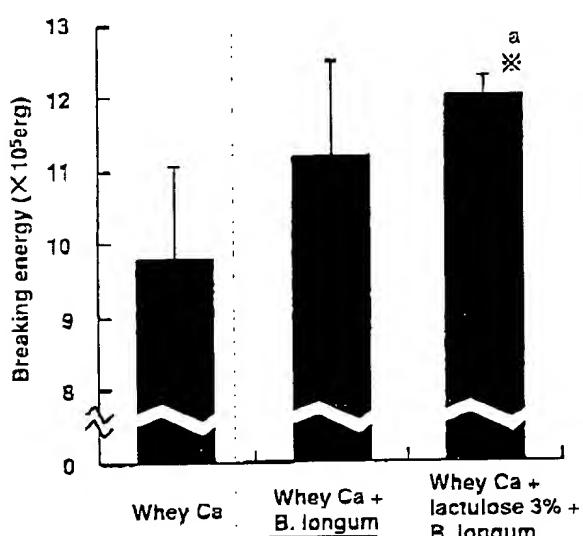


Fig. 3. Breaking energy of femur.

^a: Mean \pm SE.

*: Significant difference from whey Ca diet group ($p < 0.05$).

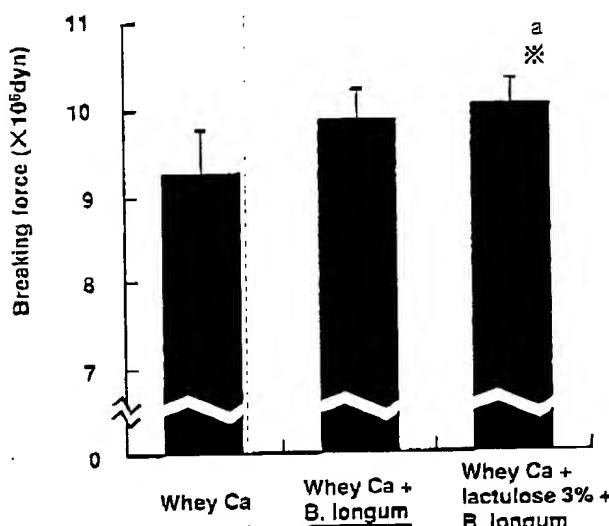


Fig. 4. Breaking force of femur.

^a: Mean \pm SE.

*: Significant difference from whey Ca diet group ($p < 0.05$).

とも①群に対し高い傾向にあった。 $\Sigma GS/D$ は②③群とも①群に対して有意に高く、また GS_{min} は①群に対し②③群とも高く、特に②群は①群より有意に高かった (Fig. 3~8).

考 案

本研究では、骨粗鬆症モデルラットを基本食と飲水の代りに1%脱脂粉乳溶液を投与した①群、基本食とビフィズス菌末懸濁液(1%脱脂粉乳溶液にビフィズス菌末を懸濁させたもの)を投与し

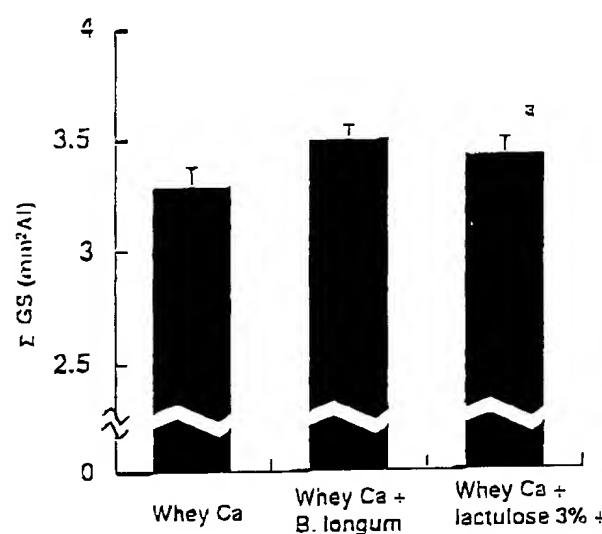


Fig. 5. ΣGS of femur.

^a: Mean \pm SE.

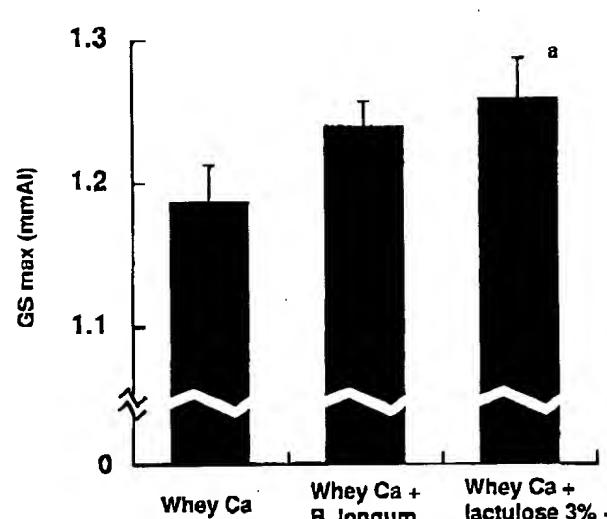


Fig. 6. GS_{max} of femur.

^a: Mean \pm SE.

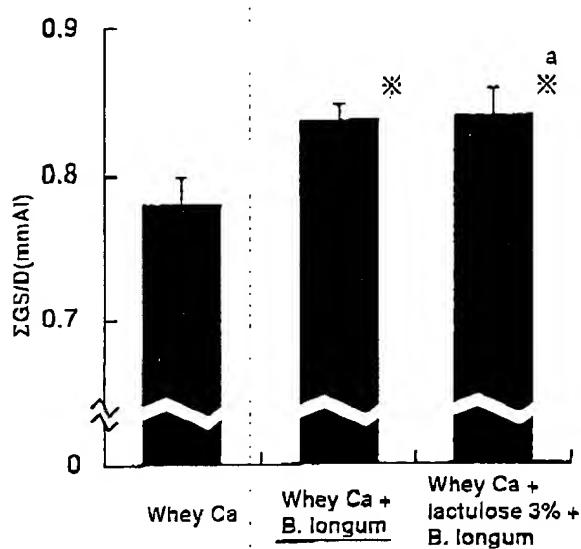
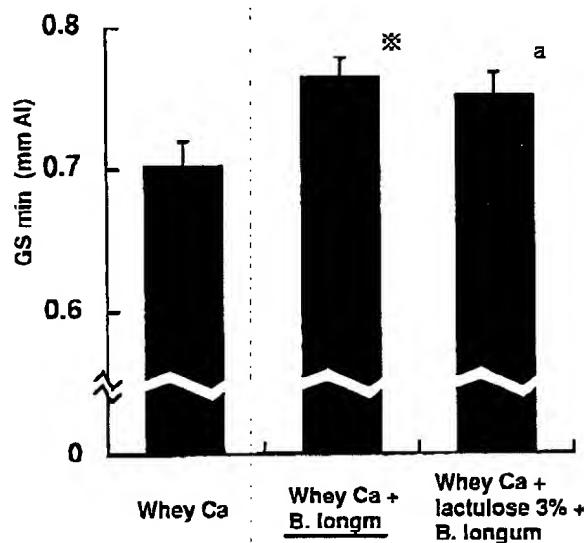


Fig. 7. ΣGS/D of femur.

: Mean \pm SE.: Significant difference from whey Ca diet group ($p < 0.05$)Fig. 8. GS_{min} of femur.*: Mean \pm SE.*: Significant difference from whey Ca diet group ($p < 0.05$).

た②群およびラクチュロースを添加した基本食とビフィズス菌末懸濁液を投与した③群に分け飼育し比較を行った。その結果、糞便中のビフィズス菌の増加は、ラクチュロースを添加した群は特に著しかった。投与したビフィズス菌はヒト由来の菌種 (*Bifidobacterium longum*) であったが、糞便中に検出されたビフィズス菌は②③とも投与菌と異

なりラット由来のものであった。この現象は体外から摂取されたビフィズス菌にラットの腸内常在ビフィズス菌が触発され生育・増殖が活発となつたことが考えられる(29)。

また、盲腸内容物のpHは糞便中にビフィズス菌が多く検出された群ほど低く、盲腸内容物のpHと糞便中のビフィズス菌数には相関が認められた。さらに盲腸内容物の有機酸のうちビフィズス菌の増殖状況の目安となる酢酸濃度も①<②<③群の順に高かった。この事実はビフィズス菌およびラクチュロース投与群の盲腸内におけるビフィズス菌の著しい増殖を裏づけるものである。ヒトにおけるカルシウムの吸収は十二指腸部位では能動輸送により、回腸部位では拡散輸送によるとされている(7)。しかしラットでは盲腸部位においても吸収されるといわれている(9, 26)。これらの報告によればカルシウムの拡散輸送による吸収は同時に摂取した乳糖等の糖質が代謝され生成した乳酸・酢酸等によりpHが低下しその結果、促進されるとしている。現在一部研究者の間ではヒトの場合もカルシウムの拡散輸送は小腸下部から大腸で行われていると考えられている(1, 23)。カルシウムの吸収性は管腔内の溶解性、小腸粘膜の通過性、食物中の共存物質との結合性(10)の三つの要因に依存するといわれており(25)、したがってその吸収には腸内細菌および摂取した食物も大きく関与していると考えられる。ラットを使用した *in vitro* の実験ではラクチュロースは小腸および盲腸(大腸)で分解されるという(15)。またヒトにラクチュロースを与えた場合、小腸下部のpHは7.5から7.05に低下したとの報告がある(4)。

ビフィズス菌は大腸だけでなく小腸下部である回腸部位においても10%程度の菌数で存在し、この部位では腸内細菌が少なく相対的にビフィズス菌が優勢なことがヒトにおいて知られており(27)、したがって、体外よりヒトの常在細菌として知られるビフィズス菌およびラクチュロースを投与すれば、体内のビフィズス菌の活性化を促し回腸部位のpHの低下によりカルシウムの可溶化が進み拡散輸送による吸収が促進されると考えられる。また同様なことがビフィズス菌濃度の高い

大腸部位においても考えられる。

以上の推察は総合的な骨強度の指標となる破断エネルギーおよび破断応力も①群に比べ②③群とも高く、とくに①群にくらべ③群は有意に高かったこと、骨密度関連パラメーターである ΣGS , GS_{max} には有意な差は認められなかつたが①群に比べ②③群とも高値を示したこと、また $\Sigma GS/D$ は①群に比べ②③群とも有意に高く、 GS_{min} については①群に対して②群が有意に高かったことからも示唆される。

また、①群と②群を比較すると糞便中のビフィズス菌数には差がみられたが、盲腸内容物中の有機酸濃度およびその pH の差はわずかであった。それにもかかわらず骨強度の指標となる破断エネルギー・破断応力および骨密度には明らかな差があった。このことは投与したビフィズス菌および／または増殖したビフィズス菌による腸内 pH 低下作用以外の生物活性作用が骨強度・骨密度に影響を及ぼしている可能性を示している。

骨強度の増強・骨密度の増加からビフィズス菌およびラクチュロースの摂取は腸内環境の改善等によりカルシウムの吸収を高め骨代謝に効果的であることが示唆された。

引用文献

- (1) 足立 達. 1966. 乳糖の生化学的作用. 乳技協資料 16: 3-14.
- (2) Allen, L.H. 1982. Calcium bioavailability and absorption. Am. J. Clin. Nutr. 35: 783-803.
- (3) Armbrecht, H.J., and R.H. Wasserman. 1976. Enhancement of Ca uptake by lactose in the rat small intestine. J. Nutr. 106: 1265-1271.
- (4) Bown, R.L., J.A. Gibson, G.E. Sladen, B. Hicks, and A.M. Dawson. 1974. Effects of lactulose and other laxatives on ileal and colonic pH as measured by a radiotelemetry device. Gut 15: 999-1004.
- (5) Drewes, P.A. 1972. Direct colorimetric determination of phosphorus in serum and urine. Clin. Chim. Acta 39: 81-88.
- (6) 江澤郁子. 1980. 去勢雄ラットの大腿骨骨折に及ぼす食事中カルシウムの影響. 日本家政学会誌 31: 712-715.
- (7) 藤田拓男. 1992. オステオポローシー診断と治療一. 財骨粗鬆症財団, 東京.
- (8) Gornal, A.G., C.J. Bardawill, and M.M. David. 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J. Biol. Chem. 177: 751-776.
- (9) 五島孜郎, 関 博歎. 1964. 無機質代謝におよぼす乳糖の影響(第1報). 日本栄養・食糧学会誌 17: 188-191.
- (10) Heaney, R.P., R.R. Recker, and C.M. Weaver. 1991. Absorbability of calcium sources: the limited role of solubility. Calcif. Tissue Int. 46: 300-304.
- (11) 本間 道, 光岡知足. 1987. ピフィズス菌. (株)ヤクト本社, 東京.
- (12) 五十嵐千恵, 江澤郁子. 1991. 卵巣摘出骨粗鬆症モデルラットの大腿骨に対する Whey Calcium および Lactulose の骨強度増強効果. 応用薬理 42: 245-253.
- (13) 五十嵐千恵, 江澤郁子, 尾形悦郎. 1990. 卵巣摘出骨粗鬆症モデルラットの骨塩減少に対する乳清カルシウムの抑制効果. 日本栄養・食糧学会誌 43: 437-443.
- (14) 井村総一, 望月俊太郎, 高田昌亮. 1981. 人工栄養の低出生体重児における便の性状と腸内菌叢について. 小児科臨床 34: 59-66.
- (15) 井上陽一, 熊倉豊秋, 相川 清. 1973. ラットにおけるラクチュロースの吸収, 分布, 排泄, 分解. 薬剤学 33: 79-85.
- (16) 兼松重幸. 1953. 成人における各種食品中のカルシウムの利用並びにカルシウム所要量. 日本栄養・食糧学会誌 6: 47-59.
- (17) 小林洋四郎, 井上 正. 1981. 図説動物実験の手技手法(別冊). 蛋白質 核酸 酵素 24: 25-42.
- (18) 厚生省保健医療局健康増進栄養課監修. 1993. 平成3年国民栄養調査成績. 国民栄養の現状 p. 29-30.
- (19) 串田一博, 井上哲郎, 山下源太郎. 1989. 手部X線による microdeusitometry 法. 骨ミネラル測定と骨粗鬆症, p. 33-41. メディカルピュー社, 東京.
- (20) Lee, Y.S., T. Noguchi, and H. Naito. 1983. Intestinal absorption of calcium in rats given diets containing casein or amino acid mixture: the role of casein phosphopeptides. Br. J. Nutr. 49: 67-76.
- (21) 光岡知足. 1980. 腸内菌の世界. 集文社, 東京.
- (22) Mitsuoka, T., T. Sega, and S. Yamamoto. 1965. Eine verbesserte Methodik der qualitativen und quantitativen Analyse der Darmflora von Menschen und Tieren. Zentralbl. Bakteriol. I. Abt. Orig. 195: 455-469.
- (23) 内藤 博. 1990. カルシウムと健康. 牛乳栄養学術研究会第5回学術フォーラム報告書, p. 80-97. (社)全国牛乳普及協会, 東京.
- (24) 野本昭三. 1983. 臨床化学検査. 臨床検査法要綱, p. 397-532. 金原出版, 東京.
- (25) 李 遼淑, 朴 真我, 内藤 博. 1992. 成長期にあるラットのカルシウム出納に及ぼすカゼインホスホペプチド(CPP)の効果. 日本栄養・食糧学会誌 45: 333-338.
- (26) 鈴木和春, 遠藤幸江, 上原万里子, 山田英明, 五島孜郎, 今村美喜郎, 塩津 晋. 1985. ミネラル吸収, 腸内フローラにおよぼす乳糖, ラクチュロース, ソルビトールの影響. 日本栄養・食糧学会誌 38: 39-42.

(27) 田中隆一郎. 1985. 乳酸菌製剤の整腸作用. 治療学 14: 613-617.

(28) 田中隆一郎, 皆 辰彦, 手嶋 久, 黒島敏方, 小平智士, 鈴木振一, 寺島経男, 務台方彦. 1980. *Bifidobacterium* の Implantation に関する研究. 小児科臨床 33: 2483-2492.

(29) 田中隆一郎, 遠山 滔, 諸富正己, 高山博夫, 南野昌信, 黒島敏方, 務台方彦. 1981. 乳酸产生菌の Implantation—腸内腐敗生産物の抑制. 光岡知足編, 腸内フローラと発癌—理研腸内フローラシンポジウム I—. 学会出版センター, 東京.

(30) 寺口 進, 川島拓司, 久保山盛雄. 1982. わが国の乳製品および生菌製剤から検出される *Bifidobacterium* 生菌数の簡易測定法. 食品衛生学雑誌 23: 39-44.